

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2003年10月9日 (09.10.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/083475 A1(51) 国際特許分類:  
37/00, C12M 1/00, C12N 15/00

G01N 33/53,

(74) 代理人: 小林 浩, 外(KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒  
104-0028 東京都中央区八重洲2丁目8番7号福岡  
ビル9階 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号:

PCT/JP03/04274

(22) 国際出願日:

2003年4月3日 (03.04.2003)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

特願2002-101675 2002年4月3日 (03.04.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三菱  
レイヨン株式会社 (MITSUBISHI RAYON CO., LTD.)  
[JP/JP]; 〒108-8506 東京都港区港南一丁目6番41号  
Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 長浜 千秋 (NAGA-  
HAMA, Chiaki) [JP/JP]; 〒230-0053 神奈川県横浜市鶴  
見区大黒町10-1 三菱レイヨン株式会社 化成品開  
発研究所内 Kanagawa (JP). 伊藤 千穂 (ITOU, Chiho)  
[JP/JP]; 〒230-0053 神奈川県横浜市鶴見区大黒町  
10-1 三菱レイヨン株式会社 化成品開発研究所内  
Kanagawa (JP).(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO,  
NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,  
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU,  
ZA, ZM, ZW.(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: GEL HAVING BIOSUBSTANCE FIXED THERETO AND MICROARRAY UTILIZING THE GEL

(54) 発明の名称: 生体関連物質固定化ゲル及び該ゲルを利用したマイクロアレイ

(57) Abstract: Gel having a biosubstance fixed thereto wherein a biosubstance is fixed to a gel containing 2 to 7 mass% of N,N-  
dimethylacrylamide.

(57) 要約:

本発明は、N，N－ジメチルアクリルアミドを2～7質量%含むゲ  
ルに生体関連物質が固定された生体関連物質固定化ゲルを提供する。

## 明 細 書

## 生体関連物質固定化ゲル及び該ゲルを利用したマイクロアレイ

## 5 技術分野

本発明は、生体関連物質固定化ゲル及びそれを用いた生体関連物質固定化ゲルマイクロアレイに関する。該マイクロアレイは、遺伝子発現解析等に使用される。

## 背景技術

- 10 現在、ヒトゲノムの解読が進み、様々な疾病や体質と特定の遺伝子配列との因果関係が明らかにされつつある。このような遺伝子分析により、例えば、発病の予測、薬剤に対する副作用の予測等を行うことが考えられている。

- 15 遺伝子の分析手段としては、ゲルを媒体とした電気泳動法が古くから使用されている。近年では、微量の生物試料を短い時間で分離分析することを目的としたキャピラリーゲル電気泳動法が開発されている。キャピラリーゲル電気泳動では、アクリルアミド等のハイドロゲルが充填されたガラス製キャピラリーが使用されている。

- また、多数の遺伝子の変異及び発現量を一括して検出できる有用なツールとして DNA、蛋白質等のキャプチャープローブ（検出の目的とする DNA や蛋白質とハイブリダイズ又は結合することにより、相手の DNA 又は蛋白質等を捕捉することが
- 20 できるプローブ）が複数、保持されたマイクロアレイが利用されている。そして、前記マイクロアレイには、ゲルを利用した各種形態のマイクロアレイが多数知られている。その内、キャプチャープローブの固定にゲルを利用したマイクロアレイとしては、例えば樹脂板等の基盤に複数の溝又は穴が形成され、該溝又は穴の内部に DNA を含むゲルが充填されたもの（特開 2000-60554 号公報参照）、
- 25 平面基盤上に DNA 等を含むゲルのスポットが配置されたもの（USP 5,770,721 号公報参照）等が知られている。また、本発明者らの一部も中空繊維の中空部にキャプチャープローブを含むゲルを保持した中空繊維配列体を作製し、該配列体の繊維軸と交差する方向に切断することにより得られるマイクロアレイを開発し、

出願している（特開 2000-270877 号、特開 2000-270878 号、特開 2000-270879 号公報参照）。

- 5      キャプチャープローブが固定されたマイクロアレイは、検体と共にハイブリダイゼーション操作を行うことにより、特定塩基配列の検出に用いられる。ハイブリッドの検出には、ハイブリッドを特異的に認識することができる公知の手段、例えば蛍光検出により行われる。

しかし、ハイブリダイゼーション後、キャプチャープローブが固定された各区画の蛍光強度を測定すると、区画の外周部での蛍光強度が高く、区画の中央部の蛍光強度が低くなるという問題があった。

10

#### 発明の開示

- 本発明は、マイクロアレイのハイブリダイゼーション反応後の検出において、区画内での蛍光強度の分布が均一であり、且つ各区画内の全体での蛍光強度の総和がより高い値、即ち高いハイブリダイゼーション効率を得られるゲル組成を得ることを目的とする。

15

本発明者らは上記問題点を解決するために鋭意検討した結果、以下の性質を満たすゲルにキャプチャープローブを固定化することにより、区画内での蛍光強度の分布が均一となり、且つ区画の蛍光強度が高くなる、即ち高いハイブリダイゼーション効率が見出し本発明に至った。

- 20      すなわち、本発明は、N,N-ジメチルアクリルアミドを 2～7 質量%含むゲルに生体関連物質が固定された生体関連物質固定化ゲルである。また、本発明は、以下の組成を含むゲルに生体関連物質が固定された生体関連物質固定化ゲルである。

- |     |                 |         |             |
|-----|-----------------|---------|-------------|
| (a) | N,N-ジメチルアクリルアミド | 2～7 質量% |             |
| 25  | (b)             | 架橋剤     | 0.1～1.5 質量% |

上記生体関連物質固定化ゲルにおいて、生体関連物質としては、例えば核酸が挙げられる。また、架橋剤としては、少なくとも 2 つのエチレン性不飽和結合を持つ多官能単量体、例えばメチレンビスアクリルアミドを例示することができる。

さらに、本発明は、N,N-ジメチルアクリルアミドを2〜7質量%含むゲルに生体関連物質を固定することを特徴とする、生体関連物質固定化ゲルの製造方法である。本発明においては、ゲルは、N,N-ジメチルアクリルアミド2〜7質量%を架橋剤0.1〜1.5質量%の存在下で反応させて得ることが好ましい。

- 5      さらに、本発明は、前記生体関連物質固定化ゲルが、中空管状体の中空部に充填されているゲル充填中空管状体である。中空管状体としては、例えば中空繊維が挙げられる。

- さらに、本発明は、前記ゲル充填中空管状体を複数本集束し、該集束物を管状体の長手方向に交差する方向に切断することを特徴とする生体関連物質固定化ゲルマイクロアレイの製造方法である。
- 10

さらに、本発明は、以下の工程を含む生体関連物質固定化ゲルマイクロアレイの製造方法である。

(a) 中空管状体を複数本集束する工程。

- (b) 得られた集束物の各管状体の中空部に前記生体関連物質固定化ゲルを充填する工程。
- 15

(c) 集束物を管状体の長手方向に交差する方向に切断する工程。

- さらに、本発明は、前記生体関連物質固定化ゲルが、複数の区画に配置された生体関連物質固定化ゲルマイクロアレイである。ここで、各区画の表面積は $10^{-6}\text{m}^2$ 以下であることが好ましい。また、生体関連物質固定化ゲルマイクロアレイは、区画が溝又は貫通孔により形成されているものを使用することができる。
- 20

さらに、本発明は、前記ゲル充填中空管状体（例えば中空繊維）を複数本集束させた集束物を、中空管状体の長手方向に交差する方向に切断して得られる生体関連物質固定化ゲルマイクロアレイである。

- さらに、本発明は、検体を前記マイクロアレイと反応させ、検体中の測定対象（例えばDNAなどの核酸）を検出することを特徴とする測定対象の検出方法である。ここで、検出の測定対象がDNAである場合は、その長さが100塩基以下であることが好ましい。
- 25

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、生体関連物質を固定化したゲル（生体関連物質固定化ゲル）であって、当該ゲルが、N,N-ジメチルアクリルアミド（2～7 質量%）の組成を含むものである。

5 本発明において、「生体関連物質」とは、キャプチャープローブとして使用する生物学的材料を意味し、例えばデオキシリボ核酸（DNA）や、リボ核酸（RNA）、蛋白質、脂質等が挙げられる。これら生体関連物質は、市販品又は生細胞等から得ることができる。

例えば、生細胞からの DNA の抽出は、Blin らの方法 [Nucleic. Acids. Res. 3. 2303 (1976)] 等により、また、RNA の抽出は、Favaloro らの方法 [Methods. 10 Enzymol. 65. 718 (1980)] 等により実施することができる。

また、DNA としては、鎖状若しくは環状のプラスミド DNA 又は染色体 DNA が用いられる。さらには、制限酵素若しくは化学的に切断した DNA 断片、試験管内で酵素等により合成された DNA 又は化学合成したオリゴヌクレオチド等を用いることもできる。

15 上記の方法等により調製された生体関連物質は、ゲル状物（以下、ゲル）に固定される。ここで「固定」とは、ゲル中に生体関連物質を保持させることを意味する。

当該ゲルの組成としては、N,N-ジメチルアクリルアミドをゲルの質量に対して 2～7 質量%含むものであるが、以下の組成が好ましい。

- 20 (a) N,N-ジメチルアクリルアミド 2～7 質量%  
(b) 架橋剤 0.1～1.5 質量%

さらには N,N-ジメチルアクリルアミドは、下限値が 2.5～5.0 質量%であることが好ましい。

架橋剤は、エチレン性不飽和結合を少なくとも 2 個以上持つ多官能性単量体が  
25 好ましく、その量は、ゲル質量に対し 0.1～1.5 質量%が好ましく、0.3～0.7 質量%がより好ましい。架橋剤は、上記多官能性単量体であれば特に限定されるものではなく、例えばメチレンビスアクリルアミド、ジビニルベンゼン、ポリエチレングリコールジ（メタ）アクリレートなどが挙げられる。

ゲルの作製方法は、N,N-ジメチルアクリルアミドと架橋剤とを水性媒体中で混合し、共重合する方法、あるいはN,N-ジメチルアクリルアミドを重合しプレポリマーとした後、架橋剤を混合し共重合する方法等が例示できる。

- 5 上述のゲルに生体関連物質を固定する方法としては、重合反応の際、末端にビニル基を導入した生体関連物質を加え、ゲルの構成成分と共重合させる方法（W002/62817 号公報参照）、ヒドラジン処理したゲルを準備し、アミノ基を有する生体関連物質を反応させる方法（特表平 6-507486 号公報参照）等が例示できる。

- 10 本発明において作製された生体関連物質固定化ゲルの透水率は、 $1.0 \times 10^{-5} \text{ m}^3 \cdot \text{m} \cdot / \text{m}^2 / \text{hr} / \text{MPa}$  以上が好ましい。該ゲルの透水率は、ゲルを透過する水の透過量から計算する。透水実験は以下の方法で測定した値と定義する。

- 厚さ 1mm、直径 20mm のゲルを作製し、サポートフィルター（Millipore SMWP04700）に重ね、濾過用ホルダー（ADVANTEC 製 UHP-43K）にセットし、ホルダー内に水を満たす。次に濾過用ホルダーを窒素圧で加圧し、ろ液の出口に直径 2mm の PE チューブを繋ぎ、ろ液の先端がチューブ中の一定距離（40cm）を移動するのに要する時間から透水量を見積もり、透水率を算出する。

また該ゲルの形態保持率は 0.4 以上が好ましい。より好ましくは 0.6 以上である。ゲルの形態保持率とは、以下の方法で測定した値と定義する。

- 20 直径 13mm、長さ 4 cm の円柱状の容器に、ゲルを作製する。容器からゲルを取り出し、25℃、密閉容器内で 24 時間放置したゲルの高さを測定する。そして、以下の式により形態保持率を算出する。

$$\text{形態保持率} = 24 \text{ 時間放置後のゲルの高さ mm} / 13 \text{ mm (初期のゲルの直径)}$$

- 25 上記の方法により作製された生体関連物質固定化ゲルは、キャプチャープローブを保持するゲルとして、遺伝子解析のツールとして使用される。

例えば、上述のゲルを中空管状体の中空部に充填し、ゲル充填中空管状体を作製することにより、その管状体を遺伝子などの解析ツールとして使用することが

できる。なお、ゲルの中空部への導入は、キャピラリーゲル電気泳動に使用されるキャピラリーカラムを作製する場合と同様の方法で充填される。

また、本発明のゲルは、マイクロアレイの構成部材としても使用できる。例えば、平面基盤上に上述のキャプチャープローブが固定されたゲル（以下、固定化  
5 ゲル）を配置することにより、平面基盤上の複数の区画に固定化ゲルが配置されたマイクロアレイを製造することができる（特表平 6-507486 号、USP  
5,770,721 号公報参照）。平面基盤としては、複数の溝又は貫通孔を有するものを使用することもできる。その場合、溝又は貫通孔によって形成された区画に、  
10 重合前又は重合開始直後の生体関連物質を含むモノマー溶液を添加し、区画内で重合反応を実施させ、架橋することにより、基盤上に生体関連物質固定化ゲルを配置させたマイクロアレイ（生体関連物質固定化ゲルマイクロアレイ）を作製することができる（特開 2000-60554 号公報参照）。

各区画に保持される生体関連物質の種類は、区画毎に異なってもよい。また、同一種類の固定化ゲルを複数個、グループ化してマイクロアレイ上に配置し  
15 ても良い。また、生体関連物質のかわりに、例えば色素が固定されたゲルを区画に保持することにより、区画の座標を決定することができる。

各区画の表面積は、通常、 $10^{-6}\text{m}^2$  以下である。下限は生体関連物質の検出が可能である限り特に制限されるものではない。

20 本発明において、中空管状体は、ガラス管、ステンレス管、中空繊維等が例示できる。加工性、取り扱いの容易さを考慮すると中空繊維を使用することが好ましい。本発明において用いることができる繊維としては、合成繊維、半合成繊維、再生繊維、無機繊維のごとき化学繊維、及び天然繊維等が挙げられる（特開 2000-270878 号公報）。合成繊維の代表例としては、ナイロン 6、ナイロン 6  
25 6、芳香族ポリアミド等のポリアミド系の各種繊維、ポリエチレンテレフタレート、ポリブチレンテレフタレート、ポリ乳酸、ポリグリコール酸等のポリエステル系の各種繊維、ポリアクリロニトリル等のアクリル系の各種繊維、ポリエチレンやポリプロピレン等のポリオレフィン系の各種繊維、ポリビニルアルコール系の各種繊維、ポリ塩化ビニリデン系の各種繊維、ポリ塩化ビニル系繊維、ポリウ

レタン系の各種繊維、フェノール系繊維、ポリフッ化ビニリデンやポリテトラフルオロエチレン等からなるフッ素系繊維、ポリアルキレンパラオキシベンゾエート系繊維、ポリメチルメタクリレートなどの（メタ）アクリル系樹脂を用いた繊維等が挙げられる。

5 半合成繊維の代表例としては、ジアセテート、トリアセテート、キチン、キトサン等を原料としたセルロース系誘導体系各種繊維、プロミックスと呼称される蛋白質系の各種繊維などが挙げられる。再生繊維の代表例としては、ビスコース法や銅ーアンモニア法、あるいは有機溶剤法により得られるセルロース系の各種再生繊維（レーヨン、キュプラ、ポリノジック等）などが挙げられる。

10 無機繊維の代表例としては、ガラス繊維、炭素繊維などが挙げられる。天然繊維の代表例としては、綿、亜麻、苧麻、黄麻などの植物繊維、羊毛、絹などの動物繊維、石綿などの鉱物繊維などが挙げられる。

天然繊維以外の中空繊維は、特殊なノズルを用いて公知の方法で製造することができる。ポリアミド、ポリエステル、ポリオレフィン等は熔融紡糸法が好ましく、ノズルとしては馬蹄型やC型ノズル、2重管ノズルなどを使用することができる。

15 熔融紡糸ができない合成高分子、半合成繊維又は再生繊維に用いられる高分子の紡糸は溶剤紡糸が好ましく用いられる。この場合も、熔融紡糸と同じく2重管ノズルを用いて、中空部に芯材として適切な液体を充填しながら紡糸することにより連続した中空部を有する中空繊維を得る。

20 上記の通り調製された中空管状体は、本発明の生体関連物質固定化ゲルを保持する基本単位とすることができる。中空管状体を使用する場合、例えば、上記の中空管状体を複数本集束し、該集束物の各中空管状体の中空部に生体関連物質固定化ゲルを充填し、管状体の長手方向に対して交差する方向に集束物を輪切りする要領で切断することにより、マイクロアレイ（生体関連物質固定化ゲルマイクロアレイ）を作製することができる（WO 00/53736 号公報参照）。なお、本発明においては、個々の中空管状体にゲルを充填させた後に集束しても良い。

この際、中空管状体を規則的に配列させて接着剤等で固定することにより、例えば縦横に中空管状体が規則的に配列した配列体を得ることができる。「規則



的に」とは、一定の大きさの枠の中に含まれる中空管状体の本数が一定となるように、集束物を順序よく配列させることをいう。

配列体の作製は、例えば以下の通り行う。すなわち、規則的に孔を形成する多孔板を2枚用意して、一方の多孔板の孔の位置と他方の多孔板の孔の位置とが対応するように両方の孔に中空管状体を通す。次に、当該多孔板同士の間隔を調整する。但し、中空管状体を孔に通す作業と多孔板同士の間隔を調整する作業の順序は逆でもよい。そして、中空管状体に張力を与え、張力を与えた状態で中空管状体間（管状体集束物の隙間）に樹脂を充填して集束した管状体を固定し、配列体を得る（特開 2001-239594 号公報）。

- 10 配列体の断面形状は特に限定されるものではなく、例えば、中空管状体を規則的に配列させることにより断面を正方形又は長方形に形成してもよく、中空管状体を同心円状に配列させて断面を円形に形成してもよい。

- 15 本発明においては、上述の配列体を長手方向（中空管状体の軸方向）と交差する方向、好ましくは長手方向に対して垂直方向に切断することにより、薄片を得る。切断方法として、例えばミクロトームを用いて配列体から薄片を切り出す方法等が挙げられる。薄片の厚みは任意に調整することができるが、通常 1～5,000  $\mu\text{m}$ 、好ましくは 10～2,000  $\mu\text{m}$  である。

得られた薄片は、生体関連物質を固定化したゲルを保持するマイクロアレイとして使用する。

- 20 マイクロアレイ中のゲルに固定されている生体関連物質は、該生体関連物質とハイブリダイズ又は結合する核酸又は蛋白質など（これらを測定対象という）のキャプチャプローブとして機能する。従って、本発明のマイクロアレイは、測定対象（核酸や蛋白質等）を検出するためのキットとして使用することができる。

- 25 検出の目的とする生体関連物質（例えば DNA などの核酸）を含む検体を調製し、これをマイクロアレイに添加してマイクロアレイのゲルに固定されている生体関連物質と反応させる。例えば、測定対象となる DNA を蛍光標識しておいて、マイクロアレイ中の DNA とハイブリダイズさせる。その後洗浄を行って未反応の DNA を除去し、蛍光強度を検出する。蛍光強度は、任意の装置（例えば市販

の DNA 検出器) を用いて検出することができる。本発明の「N, N-ジメチルアクリルアミドを 2~7 質量%含むゲルに生体関連物質が固定された生体関連物質固定化ゲル」は、反応性が良好であり、マイクロアレイの一区画あたりの蛍光強度が均一になる。その結果、高感度な検出結果を得ることができる。

5

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、本発明のマイクロアレイを用いて DNA を検出した結果を示す写真である。

図 2 は、本発明のマイクロアレイを用いて DNA を検出した結果を示す写真である。

10

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明を以下の実施例により更に詳細に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

#### 15 <実施例 1>

##### (1) ポリメチルメタクリレート (PMMA) 製中空繊維の作製

単量体組成比がメチルメタクリレート (MMA) /メチルアクリレート (MA) = 82/18 からなる、質量分子量約 9 万のアクリル樹脂を原料として、環状吐出口を有する紡糸ノズルから押出機を使用して熔融押出を行った。その結果、外径が

20

##### (2) 中空繊維配列体の作製

直径 0.32 mm の孔を有し、孔の中心間距離が 0.42 mm の多孔板であって、縦横各 3 列に合計 9 個配列された厚さ 0.1 mm の多孔板 2 枚を重ね、これらの多孔板の各孔に、前記中空繊維 9 本を通過させた。2 枚の多孔板の間隔を 50mm とし、

25

糸を張った状態で中空繊維の一方の端部から 50mm の位置と 100mm の位置の 2 ヶ所を固定した。

次に、樹脂原料を 2 枚の多孔板の間に流し込んだ。樹脂としては、ポリウレタン樹脂接着剤 (日本ポリウレタン工業 (株) ニッポラン 4276、コロネート 4403) を使用した。またこの接着剤の総重量に対し、2.5 質量%のカーボンブラ

ックを添加したものを使用した。室温で1週間静置して樹脂を硬化させた。次いで多孔板を取り除き、中空繊維配列体を得た。

### (3) 末端にビニル基を有するオリゴヌクレオチド (末端ビニル化オリゴヌクレオチド) の調製

- 5     オリゴヌクレオチドの合成は、自動合成機 DNA/RNA synthesizer (PE バイオシステムズ社製 model 394) を用いて行った。合成の最終ステップで、5' 末端にアミノ基  $[\text{NH}_2(\text{CH}_2)_6-]$  を導入し、以下に示すオリゴヌクレオチド A (配列番号 1) を合成した。同様にオリゴヌクレオチド B (配列番号 2) を合成した (但し、5' 末端にアミノ基は導入していない)。5' 末端のアミノ基の導入は、
- 10    アミノリンク II<sup>TM</sup> (アプライドバイオシステム社製) を使用した。

これらのオリゴヌクレオチドは、一般的手法により脱保護及び精製して使用した。

〔オリゴヌクレオチド A (配列番号 1)〕

caaccaacca caactacata cacatac

- 15    〔オリゴヌクレオチド B (配列番号 2)〕

gtcatttaga caactctgca agcgt

- 次に、オリゴヌクレオチド A (500nmol/ml) 5  $\mu\text{l}$  とグリシジルメタクリレート 0.5  $\mu\text{l}$  を混合し、70℃で2時間反応させた。反応終了後、水を加えて全量を 25  $\mu\text{l}$  とし、100nmol/ml の末端にメタクリレート基を有するオリゴヌクレオチド (GMA 変性オリゴヌクレオチド A) を得た。
- 20    ド (GMA 変性オリゴヌクレオチド A) を得た。

### (4) 末端ビニル基導入オリゴヌクレオチドの PCR 反応

- サッカロマイセス・セルビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) JCM7255 を YPD 培地 (グルコース 20 g/L、酵母エキス 10 g/L、ポリペプトン 20 g/L pH6.0) 100ml で 30℃、1 日培養を行った後、集菌した。集菌した菌体から定法
- 25    により染色体 DNA を調製し、PCR の鋳型に用いた。

GMA 変性オリゴヌクレオチド A 及びオリゴヌクレオチド B を滅菌水で、それぞれ 50  $\mu\text{M}$  及び 5  $\mu\text{M}$  に希釈した。前記オリゴヌクレオチドをプライマーとして使用し、上述で調製した鋳型を用いて、ポリメラーゼ連鎖反応 (以下、PCR) を行った。

PCR 条件は Ex-Taq (宝酒造) の仕様書に従い、TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL を用いて行った。反応は  $100\mu\text{l}$  で行い、温度条件は  $93^{\circ}\text{C}$  30 秒、 $65^{\circ}\text{C}$  30 秒、 $72^{\circ}\text{C}$  2 分を 30 サイクル行った。PCR によって末端ビニル化核酸 (キャプチャープローブ A : 配列番号 3) が増幅された。

#### 5 (5) モノマー液及び重合開始剤液の調製

表 1 に示す組成からなる重合液 1 及び重合液 2 を調製した。モノマー液 A 及び重合開始剤液は、下記のとおり調製した。

〔モノマー液 A〕

ジメチルアクリルアミド 0.45 g 及びメチレンビスアクリルアミド 0.05 g  
10 をグリセリン/純水=50/50 (質量比) 混合溶媒に溶解し全量を 10ml とした。

〔重合開始剤液〕

2, 2'-アゾビス (2-イニダゾリン-2-イル) プロパン) ジヒドロクロライド 1 g を純水に溶解し、全量を 10ml とした。

<表 1>

	重合液 1	重合液 2
モノマー溶液 A	$1000\mu\text{l}$	$1000\mu\text{l}$
開始剤溶液	$10\mu\text{l}$	$10\mu\text{l}$
キャプチャープローブ A (100nmol/ml)	$5\mu\text{l}$	0

15

#### (6) 薄片の製造

(2) で得られた中空繊維配列体の中央列の 3 本の中空繊維の中空部に重合液 1 を充填し、残りの中空繊維の中空部には、重合液 2 を充填した。重合液 1 及び重合液 2 を充填した。内部が水蒸気で飽和された密閉ガラス容器に移し、 $55^{\circ}\text{C}$   
20 で 1 時間放置することにより重合反応を行った。

重合後、中空繊維配列体を、ミクロトームを用いて、中空繊維の長手方向と垂直に交差する方向で切断を繰り返した。その結果、厚さ約  $500\mu\text{m}$  の薄片を得た。

#### (7) ハイブリダイゼーション

キャプチャープローブ A の塩基配列の一部（配列番号 3 の 241～339 番目）に相補である 200 fmol/ml のオリゴヌクレオチド C（配列番号 4）を含むハイブリダイゼーション溶液を調製した。

- オリゴヌクレオチド C は（3）に記載の方法と同様に DNA 自動合成装置を用いて合成し、5' 末端に Cy5 を導入した。合成終了後、一般的手法により脱保護及び精製したものを使用した。

〔オリゴヌクレオチド C（配列番号 4）〕

gccacaatg gaatgttgat tgggcccaaa ccaccttcct ttcttgggat attggtccat  
gccaaaaggg agtattcgga gtcagtggag gcgaaaaga

10

<ハイブリダイゼーション溶液組成>

5×SSC (0.75mol/L 塩化ナトリウム、0.075mol/l クエン酸ナトリウム、pH 7.0)

0.02% SDS (ラウリル硫酸ナトリウム)

- 15 ハイブリパックに（6）で得られた薄片及び前記ハイブリダイゼーション溶液 1ml をそそぎ込み、パックの上端を熱シールした。ハイブリダイゼーションは 65℃で 20 時間行った。

#### （8）洗浄

ハイブリパックから、薄片を取り出し、表 2 に示す条件で順に洗浄を行った。

- 20 洗浄溶液の容量は 10ml とした。

<表 2>

洗浄液組成		洗浄温度	洗浄時間
2×SSC	0.2% SDS	25℃	20分
0.2×SSC	0.2% SDS	25℃	20分
0.2×SSC	0.2% SDS	55℃	20分
0.2×SSC	0.2% SDS	55℃	20分
0.2×SSC	0.2% SDS	25℃	20分

### (9) 検出

洗浄後の薄片を、無蛍光スライドガラスにのせ、数滴滅菌水を薄片上に滴下し、カバーガラスをかぶせた。スライドガラスを DNA チップ検出器 (GeneTac V : Genomic Solutions 社製) にセットし、Cy5 用レーザーを用いて検出した。画像は 1 ピクセル 10  $\mu\text{m}$  の大きさに設定した。

### (10) 蛍光強度の測定

区画中央部周辺 80 ピクセル分の蛍光強度の総和を区画の強度とし、算出した。蛍光強度及び洗浄後の中空繊維周辺の画像を図 1 に示した。区画の中央部は任意に決定した。その結果、ハイブリダイゼーションした区画の蛍光強度の分布は均一であった。

### <比較例 1>

モノマー液 A をモノマー液 B に変更した以外は、実施例 1 と同様に操作を行った。

#### 15 [モノマー液 B]

アクリルアミド 0.475g、メチレンビスアクリルアミド 0.025g をグリセリン/純水=50/50 (質量比) 混合溶媒に溶解し、全量を 10ml とした。

蛍光強度及び洗浄後の中空繊維周辺の画像を図 1 に示した。

ハイブリダイゼーションした中空部の蛍光強度の分布は均一であるが、蛍光強度が実施例 1 と比較して低下していた。

### <比較例 2>

モノマー液 A をモノマー液 C に変更した以外は、実施例 1 と同様に操作を行った。

#### 25 [モノマー液 C]

アクリルアミド 0.76g、メチレンビスアクリルアミド 0.04g をグリセリン/純水=50/50 (質量比) 混合溶媒に溶解し、全量を 10ml とした。蛍光強度及び洗浄後の中空繊維周辺の画像を図 1 に示した。

蛍光強度は実施例 1 より低く、中空部での蛍光強度は周辺部で高く、中心部で低くなっていた。

### <実施例 2>

- 5     モノマー液 A をモノマー液 D、キャプチャープローブ A をキャプチャープローブ B（配列番号 5）に変えた以外は、実施例 1 と同様に操作を行い、薄片を調製した。なお、キャプチャープローブ B は 5' 末端にアミノ基を導入し、その後、グリシジルメタクリレートと反応させ、末端にメタクリレート基を有する構造とした。

10    [モノマー液 D]

ジメチルアクリルアミド 0.27 g 及びメチレンビスアクリルアミド 0.03 g をグリセリン/純水=50/50 (質量比) 混合溶媒に溶解し、全量を 10ml とした。

[キャプチャープローブ B（配列番号 5）]

- 15    aaatacgccct gcaggcggag atcttccagg cccgcctcaa gggctgggttc gagccaatag  
tggaagacat

ハイブリダイゼーション及び洗浄は、以下の方法で行った。

#### (1) ハイブリダイゼーション

- 20    キャプチャープローブ B の塩基配列に対する相補配列を一部（配列番号 6 の 16～85 番目）に含む 1pmol/ml のオリゴヌクレオチド E（配列番号 6）を含むハイブリダイゼーション溶液を調製した。

オリゴヌクレオチド E は DNA 自動合成装置を用いて合成し、5' 末端に Cy5 を導入した。合成終了後、一般的手法により脱保護及び精製したものを使用した。

25

[オリゴヌクレオチド E（配列番号 6）]

gccactggc gatgcatgtc ttccactatt ggctcgaacc agcccttgag gcgggcctgg  
aagatctccg cctgcaggcg tatttgctgg gtctgttcc

## 〔ハイブリダイゼーション溶液組成〕

6×SSC (0.75mol/L 塩化ナトリウム、0.075mol/l クエン酸ナトリウム、pH 7.0)、

0.02% SDS (ラウリル硫酸ナトリウム)

5

ハイブリパックに得られた薄片及び前記ハイブリダイゼーション溶液 1ml をそそぎ込み、パックの上端を熱シールした。ハイブリダイゼーションは 37℃で 16 時間行った。

(2) 洗浄

- 10 ハイブリパックから、薄片を取り出し、表 3 に示す条件で順に洗浄を行った。洗浄温度は 45℃とした。洗浄溶液の容量は 10ml とした。

表 3

0.2×SSC	0.1%SDS	20 分
0.2×SSC	0.1%SDS	20 分
0.2×SSC		20 分

(3) 検出

- 15 洗浄後の薄片を、無蛍光スライドガラスにのせ、数滴滅菌水を薄片上に滴下し、カバーガラスをかぶせた。スライドガラスを、DNA チップ検出器 (GeneTac IV : Genomic Solutions 社製) にセットし、Cy5 用レーザーを用いて検出した。画像は 1 ピクセル 10 μm の大きさに設定した。

20 (4) 蛍光強度の測定

区画中央部周辺の 200 ピクセル分の、蛍光強度の平均値を区画強度とし、算出した。

蛍光強度及び洗浄後の中空繊維周辺の画像を図 2 に示した。区画の中央部は任意に決定した。その結果、ハイブリダイゼーションした区画の蛍光強度の分布

- 25 は均一であった。

## &lt;実施例 3&gt;



モノマー液 D をモノマー液 A に変えた以外は、実施例 2 と同様に操作を行った。区画の蛍光強度及び洗浄後の中空繊維周辺の画像を図 2 に示した。区画の中央部は任意に決定した。その結果、ハイブリダイゼーションした区画の蛍光強度の分布は均一であった。

5

### < 比較例 3 >

モノマー液 A をモノマー液 E に変更した以外は実施例 2 と同様に操作を行った。

[モノマー液 E]

- 10 N,N-ジメチルアクリルアミド 0.72g、メチレンビスアクリルアミド 0.08g をグリセリン/純水=50/50(質量比)混合溶媒に溶解し、全量を 10ml とした。

蛍光強度及び洗浄後の中空繊維周辺の画像を図 2 に示した。蛍光強度は実施例 2 より低く、中空部での蛍光強度は周辺部で高く、中心部で低くなっていた。

15

### < 比較例 4 >

モノマー液 A をモノマー液 F に変更した以外は実施例 2 と同様に操作を行った。

- 20 [モノマー液 F]

N,N-ジメチルアクリルアミド 0.18g、メチレンビスアクリルアミド 0.02g をグリセリン/純水=50/50(質量比)混合溶媒に溶解し、全量を 10ml とした。

- 25 薄片化したチップは、ゲルが脱落し、中空部に充填されていなかった (図 2)。

産業上の利用可能性

本発明により、生体関連物質が固定されたゲルが提供される。本発明のゲルを使用することにより、区画内の蛍光強度が均一で、より高いハイブリダイゼーション効率が得られるため、DNAなどの遺伝子検出に有用である。

5        配列表フリーテキスト

配列番号 1 : 合成 DNA

配列番号 2 : 合成 DNA

配列番号 3 : 合成 DNA

配列番号 4 : 合成 DNA

10       配列番号 5 : 合成 DNA

配列番号 6 : 合成 DNA

## 請 求 の 範 囲

1. N,N-ジメチルアクリルアミドを2～7質量%含むゲルに生体関連物質が固定された生体関連物質固定化ゲル。
- 5 2. 以下の組成を含むゲルに生体関連物質が固定された生体関連物質固定化ゲル。
  - (a) N,N-ジメチルアクリルアミド 2～7 質量%
  - (b) 架橋剤 0.1～1.5 質量%
3. 生体関連物質が核酸である請求項1又は2記載の生体関連物質固定化ゲル。
4. 架橋剤が、少なくとも2つのエチレン性不飽和結合を持つ多官能単量体である請求項2又は3記載の生体関連物質固定化ゲル。
- 10 5. 架橋剤が、メチレンビスアクリルアミドである請求項4記載の生体関連物質固定化ゲル。
6. N,N-ジメチルアクリルアミドを2～7質量%含むゲルに、生体関連物質を固定することを特徴とする、生体関連物質固定化ゲルの製造方法。
- 15 7. ゲルが、N,N-ジメチルアクリルアミド2～7質量%を架橋剤0.1～1.5質量%の存在下で反応させて得られたものである請求項6記載の方法。
8. 請求項1～5のいずれかに記載の生体関連物質固定化ゲルが、中空管状体の中空部に充填されているゲル充填中空管状体。
9. 中空管状体が中空繊維である請求項8記載のゲル充填中空管状体。
- 20 10. 請求項8又は9記載のゲル充填中空管状体を複数本集束し、得られる集束物を管状体の長手方向に交差する方向に切断することを特徴とする生体関連物質固定化ゲルマイクロアレイの製造方法。
11. 以下の工程を含む生体関連物質固定化ゲルマイクロアレイの製造方法。
  - (1) 中空管状体を複数本集束する工程。
  - 25 (2) 得られた集束物の各管状体の中空部に請求項1～5のいずれかに記載の生体関連物質固定化ゲルを充填する工程。
  - (3) 集束物を管状体の長手方向に交差する方向に切断する工程。
12. 請求項1～5のいずれかに記載の生体関連物質固定化ゲルが、複数の区画に配置された生体関連物質固定化ゲルマイクロアレイ。

- 1 3. 各区画の表面積が  $10^{-6}\text{m}^2$  以下である請求項 1 2 記載の生体関連物質固定化ゲルマイクロアレイ。
- 1 4. 区画が溝又は貫通孔により形成されている請求項 1 2 又は 1 3 記載の生体関連物質固定化ゲルマイクロアレイ。
- 5 1 5. 請求項 8 又は 9 記載のゲル充填中空管状体を複数本集束させた集束物を、中空管状体の長手方向に交差する方向に切断して得られる生体関連物質固定化ゲルマイクロアレイ。
- 1 6. 中空管状体が中空繊維である請求項 1 5 記載の生体関連物質固定化ゲルマイクロアレイ
- 10 1 7. 検体を、請求項 1 2 ～ 1 6 のいずれかに記載のマイクロアレイと反応させ、検体中の測定対象を検出することを特徴とする測定対象の検出方法。
- 1 8. 測定対象が核酸である請求項 1 7 記載の方法。
- 1 9. 核酸が 100 塩基以下の長さを有するものである請求項 1 8 記載の方法。

図 1













	実施例 1	比較例 1	比較例 2
スポット強度	5240963	1525464	1505942
スポット画像			
重合液 1 により作成ゲル			
重合液 2 により作成ゲル			

図 2

	実施例 2	実施例 3	比較例 3	比較例 4
スポット強度	20831	15595	11272	—
スポット画像				
重合液 1 により 作成したゲル				ゲル脱落
重合液 2 により 作成したゲル				ゲル脱落

## 配列表

## SEQUENCE LISTING

<110> Mitsubishi Rayon Co., LTD.

<120> BIOPOLYMER IMMOBILIZED GEL AND MICROARRAY USING THE SAME

<130> P03-0047PCT

<150> JP2002-101675

<151> 2002-04-03

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SYNTHETIC DNA

<400> 1

caaccaacca caactacata cacatac

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SYNTHETIC DNA

<400> 2

gtcatttaga caactctgca agcgt

25

<210> 3

<211> 651

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SYNTHETIC DNA

<400> 3

caaccaacca caactacata cacatacata cacaatggtc gctcaagttc aaaagcaagc 60  
tccaactttt aagaaaactg ccgtcgtcga cgggtgtcttt gacgaagtct ccttggacaa 120  
atacaagggt aagtacgttg tcctagcctt tattccattg gccttcactt tcgtctgtcc 180  
aaccgaaatc attgctttct cagaagctgc taagaaattc gaagaacaag gcgctcaagt 240  
tcttttcgcc tccactgact ccgaatactc ccttttgga tggaccaata tccaagaaa 300  
ggaagggtgt ttgggcccaa tcaacattcc attgttggt gacaccaacc actctttgtc 360  
cagagactat ggtgtcttga tcgaagaaga aggtgtcgcc ttgagagggt tgttcatcat 420

3/4

cgacccaaag ggtgtcatta gacacatcac cattaacgat ttgccagtcg gtagaaacgt 480  
tgacgaagcc ttgagattgg ttgaagcctt ccaatggacc gacaagaacg gtactgtctt 540  
gccatgtaac tggactccag gtgctgctac catcaagcca accgttgaag actccaagga 600  
atacttcgaa gctgccaaca aataagacgc ttgcagagtt gtctaaatga c 651

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 99

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:SYNTHETIC DNA

&lt;400&gt; 4

gccacaatg gaatgttgat tgggccc aaa ccaccttcct ttcttgggat attggtccat 60  
gcaaaaaggg agtattcgga gtcagtggag gcgaaaaga 99

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 70

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:SYNTHETIC DNA

&lt;400&gt; 5



aaatacgcct gcaggcggag atcttccagg cccgcctcaa gggctgggtc gagccaatag 60  
tggaagacat 70

<210> 6

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SYNTHETIC DNA

<400> 6

gcccactggc gatgcatgtc ttccactatt ggctcgaacc agcccttgag gcgggcctgg 60  
aagatctccg cctgcaggcg tatttgctgg gtctgttcc 99

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP03/04274

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/53, G01N37/00, C12M1/00, C12N15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/53, G01N37/00, C12M1/00, C12N15/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2003	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2001-248072 A (Mitsubishi Rayon Co., Ltd.), 14 September, 2001 (14.09.01), & WO 00/53736 A & AU 200028304 A & EP 1158047 A & NO 200104319 A & KR 2001103039 A & CN 1348493 A	1-19
A	JP 11-513740 A (Novartis AG.), 24 November, 1999 (24.11.99), & WO 97/15832 A & ZA 9608854 A & AU 9672903 A & EP 862741 A & DE 69642624 E & US 6252024 B	1-19
A	JP 2002-500374 A (Clontech Laboratories, Inc.), 08 January, 2002 (08.01.02), & WO 99/35289 A & AU 9920280 A & US 6087102 A & EP 1051513 A	1-19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 02 June, 2003 (02.06.03)	Date of mailing of the international search report 17 June, 2003 (17.06.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/04274

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 63-503150 A (Southwest Foundation for Biomedical Research), 17 November, 1988 (17.11.88), & WO 87/06594 A & AU 8773094 A & EP 265501 A & DK 8706911 A & US 5028675 A & CA 1339670 A	1-19
E,A	JP 2003-83967 A (Mitsubishi Rayon Co., Ltd.), 19 March, 2003 (19.03.03), (Family: none)	1-19

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup>	G01N 33/53	G01N 37/00 C12M 1/00 C12N 15/00
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup>	G01N 33/53	G01N 37/00 C12M 1/00 C12N 15/00
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2003年 日本国登録実用新案公報 1994-2003年 日本国実用新案登録公報 1996-2003年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2001-248072 A(三菱レイヨン株式会社) 2001. 09. 14 & WO 00/53736 A & AU 200028304 A & EP 1158047 A & NO 200104319 A & KR 2001103039 A & CN 1348493 A	1-19
A	JP 11-513740 A(ノバルティス・アクチエンゲゼルシャフト) 1999. 11. 24 & WO 97/15832 A & ZA 9608854 A & AU 9672903 A & EP 862741 A & DE 69642624 E & US 6252024 B	1-19
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	02. 06. 03	国際調査報告の発送日 17.06.03
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 宮澤 浩	2 J 9407
電話番号 03-3581-1101		内線 3251

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2002-500374 A(クローンテック ラボラトリーズ インク.) 2002. 01. 08 & WO 99/35289 A & AU 9920280 A & US 6087102 A & EP 1051513 A	1-19
A	JP 63-503150 A(サウスウエスト・ファウンデーション・フオー・ バイオメディカル・リサーチ)1988. 11. 17 & WO 87/06594 A & AU 8773094 A & EP 265501 A & DK 8706911 A & US 5028675 A & CA 1339670 A	1-19
E, A	JP 2003- 83967 A(三菱レイヨン株式会社)2003. 03. 19 (ファミリー無し)	1-19